

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/18322 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Mai 1997 (22.05.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/02183 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. November 1996 (14.11.96) (30) Prioritätsdaten: 195 42 795.5 16. November 1995 (16.11.95) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE]; Ernst-Ludwig-Allee 25, D-63303 Buchschlag-Sprendlingen (DE). (74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregentenstrasse 16, D-80538 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD OF QUANTIFYING TUMOUR CELLS IN A BODY FLUID AND A SUITABLE TEST KIT (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON TUMORZELLEN IN EINER KÖRPERFLÜSSIGKEIT UND DAZU GEEIGNETE TESTKITS (57) Abstract The disclosure relates to a method of quantifying tumour cells in a body fluid. A reaction is first carried out with the sample under investigation by which the RNA component of the telomerase is specifically amplified. The quantity of amplified nucleic acid is then quantitatively determined. Also disclosed are suitable test kits. (57) Zusammenfassung Offenbart wird ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst mit der zu untersuchenden Probe eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die RNA-Komponente der Telomerase spezifisch amplifiziert wird, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits.		

Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer
Körperflüssigkeit und dazu geeignete Testkits

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst mit der zu untersuchenden Probe eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die RNA-Komponente der Telomerase spezifisch amplifiziert, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits.

Nahezu alle soliden malignen Tumore haben das Potential zur Metastasenbildung. Der Prozeß der Metastasierung beinhaltet die Aussaat maligner Zellen als Mikrometastasen, zumeist auf dem Blut- bzw. Lymphweg in entfernte Organe und die Ausbildung autonomer Tochtergeschwülste. Das Ausmaß der Filiarisierung bestimmt die Prognose eines Tumorleidens.

Die Ansprüche von Tumurvorsorge- oder Nachsorgeprogrammen liegen in der Früherkennung von Primärtumoren bzw. eines Rezidivs oder einer Metastasierung noch bevor Metastasen klinisch manifest werden. Dieses Ziel kann bislang mit den verfügbaren apparativen Techniken nicht zufriedenstellend erfüllt werden, insbesondere gibt es immer noch eine diagnostische Grauzone zwischen zirkulierenden Tumorzellen und beginnender Metastasenbildung in Organen. Durch die Frühdiagnose zirkulierender maligner Zellen z. B. im peripheren Blut eines Tumornachsorgepatienten könnte frühzeitig, d.h. noch vor einer manifesten

Organmetastasierung, eine möglicherweise kurative Immunmodulations- oder Polychemotherapie ergriffen werden. Die Quantifizierung der Metastasen im peripheren Blut vor und nach der Therapie stellt dabei eine wichtige Kontrolle dar.

In GB 2 260 811 wird beispielsweise ein Diagnoseverfahren zum Nachweis von malignen Tumoren vorgeschlagen, die mit normalen Zellen eines bestimmten Körpergewebes assoziiert sind, wobei die normalen Zellen mindestens ein für dieses Gewebe spezifisches Genprodukt bilden. Bei diesem Nachweisverfahren wird dem Patienten Körperflüssigkeit, beispielsweise Blut, entnommen, in der die Zellen bei einem gesunden Menschen normalerweise nicht vorkommen, und die mRNA des spezifischen Genproduktes amplifiziert und nachgewiesen. Als Beispiel wird die Tyrosinase zum Nachweis von Melanomzellen in peripherem Blut genannt. Nachteil dieser Methode ist jedoch, daß sie an gewebespezifische Genprodukte gebunden ist, eine Quantifizierung der Melanomzellen nicht ermöglicht und auch falsch-positive Ergebnisse liefert.

Kim et al. beschreiben die Ergebnisse eines Assays, mit dem Telomeraseaktivitäten in Tumorgeweben bestimmt werden konnte [Kim et al. (1994). Science 266: 2011]. Die Telomerase-Aktivität wurde mit einer Sensitivität von ca. 1 immortale Zelle/104 normale Zellen in 98 von 100 Krebszellkulturen bzw. 90 von 101 malignen Tumoren als auch in Keimgeweben nachgewiesen, nicht aber in 22 normalen somatischen Zellkulturen.

Die Telomerase ist ein neu beschriebenes Ribonukleoprotein mit reverser Transkriptaseaktivität [Shippen-Lentz et al. (1990), Science 247: 546], das als Matrize eine integrale RNA-Sequenz zur unabhängigen DNA-Synthese benutzt [Greider et al. (1989). Nature 337: 331], mit der neue telomere DNA an die Enden der Chromosomen synthetisiert werden. Telomere bestehen aus hoch konservierten (TTAGGG)_n Tandemsequenzen von ca. 5-15 Kilobasen (kb) Länge/Zellgenom und haben die Aufgabe die Chromosomen an der Kernmembran zu stabilisieren und schützen die kodierende

genomische DNA vor unkontrollierter Rekombination und Degradation [Mehle et al. (1994). Cancer Res 54: 236]. Während in den niederen Eukaryonten ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Verkürzung der Chromosomenenden und der de novo Synthese von telomeren Sequenzen durch die Telomerase postuliert wird, zeigen normale humane somatische Zellen eine niedrige oder nicht nachweisbare Telomeraseaktivität. Darüberhinaus ist die Telomerase im Gegensatz zu anderen DNA Enzymen nicht wachstumsreguliert, denn keine der aktiv proliferierenden Zellkulturen zeigte nachweisbare Telomeraseaktivität. Einzig Keimzellen und fast alle Tumorzelllinien [Ohyashiki et al. (1994). Cancer Genet Cytogenet 78: 64; Rogalla et al. (1994). Cancer Genet Cytogenet 77: 19; Schwartz et al. (1995). Cancer 75: 1094] und Tumorgewebe (Lunge, [Hiyama et al. (1995). Oncogene 10: 937; Shirotani et al. (1994). Lung Cancer 11: 29], Nieren [Mehle et al. (1994). Cancer Res 54: 236], Ovarien [Chadeneau et al. (1995). Cancer Res 55: 2533] und Blut [Counter et al. (1995). Blood 85: 2315]) zeigen meßbare Telomeraseaktivität und eine konstante Telomerlänge, die durch eine unendliche Zahl von Zellteilungen hindurch beibehalten wird. Daher kann die Aktivierung der Telomerase mit der damit verbundenen Stabilisierung der Telomerlängen als kritischer Schritt in Richtung Immortalisierung von somatischen Zellen gewertet werden.

Feng et al. gelang die Klonierung der integralen RNA-Sequenz der humanen Telomerase (hTR), die auf dem distalen Segment (q) von Chromosom 3 kodiert wird. Die Autoren konnten mittels kompetitiver Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine signifikante Erhöhung der Telomeraseexpression in Tumorgewebe sowie in den Keimgewebe gegenüber normalen somatischen Zellen belegen [Feng et al. (1995), Science 269: 1236]. Ein Antisense-Konstrukt der hTR-Sequenz verursachte den Zelltod (Apoptose) in transfizierten HeLa-Zellen. Diese Daten belegen die stringente Repression der Telomerase in somatischen Geweben als auch die Tatsache, daß malignes Wachstum von der Präsenz

immortaler Zellen und von der Aktivierung der Telomerase abhängig ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem man Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit quantitativ bestimmen kann.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst mit der zu untersuchenden Probe eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die RNA-Komponente der Telomerase spezifisch amplifiziert, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits. Als Körperflüssigkeit im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man beispielsweise Blut, Urin aber auch Stuhl, Exsudate oder Transsudate von Körperhöhlen, insbesondere peripheres Blut.

Beispielsweise wird peripheres Blut durch Punktion einer Arterie, Vene oder Fingerkuppe dem Probanden entnommen und in einem RNA-Lysispuffer der beispielsweise Harnstoff oder vorzugsweise Guanidiniumisothiocyanat enthält, überführt, um eventuell vorhandene RNasen zu denaturieren und die Nukleinsäuren aus den Zellen freizusetzen [siehe z. B. Chomczynski et al. (1987) Anal. Biochem. 162, 156]. Die Isolierung der Nukleinsäuren aus dem stark salzhaltigen Medium des RNA-Lysispuffers kann beispielsweise mittels Siliciumdioxid-Partikel erfolgen, an die sämtliche Nukleinsäuren binden können [Boom et al. (1990) J. Clin. Microbiol., 29, 495]. Danach werden die Partikel mit geeignetem Puffer mehrmals gewaschen und die gebundenen Nukleinsäuren eluiert. Anschließend ist es vorteilhaft die in der Probe eventuell vorhandene genomische DNA mittels RNase-freier DNase in einem geeigneten Puffer zu hydrolysieren, damit bei der späteren Amplifizierung der RNA-Komponente der Telomerase keine falsch-positiven Ergebnisse bzw. ein zu großes Hintergrundrauschen durch falsche Amplifizierungssignale aufgrund eventuell noch vorhandener DNA

entstehen. Anschließend erfolgt im allgemeinen eine Inaktivierung der DNase beispielsweise durch Phenolextraktion und/oder Hitzedenaturierung. Vor oder vorzugsweise nach Behandlung der Probe mit DNase kann vorteilhafterweise noch eine weitere Reinigung der in der Probe vorhandenen RNA beispielsweise mittels chromatographischer Methoden wie die Ionenaustausch-Chromatographie vorzugsweise an Kieselgel erfolgen.

Zur Kontrolle, ob noch eventuell störende genomische DNA in der Probe vorhanden ist, kann anschließend eine Amplifizierungsreaktion mit den unten beschriebenen Telomerase-spezifischen Oligonukleotid-Primern durchgeführt werden, wobei die in der Probe vorhandene RNA vorher nicht in cDNA durch eine reverse Transkriptionsreaktion umgeschrieben wird. Nur für den Fall, daß die Probe frei ist von Telomerase-spezifischer DNA erfolgt keine Amplifikation mit der Folge, daß keine amplifizierte DNA gemessen werden kann.

Anschließend erfolgt eine Umschreibung der in der Probe vorhandenen RNA in cDNA im allgemeinen mit Hilfe der reversen Transkriptionsreaktion z. B. mit der AMV reversen Transkriptase. Das Verfahren ist allgemein bekannt und beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 beschrieben. In einer bevorzugten Ausführungsform der reversen Transkription kann auch eine thermostabile RNA-abhängige DNA Polymerase, wie in WO 90/07641 beschrieben, verwendet werden. Als Oligonukleotid-Primer für die reverse Transkriptase eignen sich beispielsweise vorteilhafterweise die unten beschriebenen Oligonukleotid-Primer oder Random Primer einer bestimmten Länge.

Die anschließende Amplifizierung kann beispielsweise mit einer DNA-Polymerase z. B. nach der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt werden (siehe z. B. U.S. Patent Nos 4,683,195; 4,683,202; 4,965,188) oder vorzugsweise mit einer RNA-Polymerase nach z. B. der isothermalen Nukleinsäuresequenz-

basierenden Amplifikation (NASBA). In jedem Fall benötigt man für die Amplifizierung spezifische Oligonukleotid-Primer, die von der zu amplifizierenden Nukleinsäure abgeleitet sind. Bei der vorliegenden Erfindung kann jeder beliebige Sequenzabschnitt der RNA-Komponente der Telomerase für die Synthese der Oligonukleotid-Primer verwendet werden. Vorzugsweise sind die Oligonukleotid-Primer ca. 20 bis ca. 30, vorzugsweise ca. 20 bis ca. 25 Nukleotide lang. Das Amplifikationsprodukt ist im allgemeinen ca. 100 bis ca. 2000 Basen, vorzugsweise ca. 200 bis ca. 1500 Basen, insbesondere ca. 300 bis ca. 350 Basen lang. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sind insbesondere folgende Oligonukleotid-Primer bevorzugt, die aus der Sequenz gemäß Abb. 1 abgeleitet wurden:

5' GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3' (TM1), und/oder

5' CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3' (TM2),

wobei TM1 und/oder TM2 gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können. Der Oligonukleotid-Primer TM1 entspricht dem 5'-Primer und TM2 dem 3'-Primer. Das Amplifikationsprodukt ist 327 bp lang. Die Primer können beispielsweise synthetisch nach der Triestermethode hergestellt werden [Matteucci et al., (1981), J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191]. Als DNA-Polymerase kann beispielsweise eine nicht-thermostabile DNA-Polymerase wie die T4 DNA Polymerase, T7 DNA Polymerase, E. coli Polymerase I oder das Klenow Fragment von E. coli oder vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase wie die Taq-Polymerase (siehe z. B. U.S. Patent No. 4,889,818) verwendet werden.

Das allgemeine Prinzip der PCR-Reaktion besteht nun darin, daß während mehrerer sich wiederholender Reaktionszyklen die DNA hitzedenaturiert wird und in Anwesenheit geeigneter Oligonukleotid-Primer mit gegenseitiger Orientierung der Einzelstrang mit Hilfe der DNA-Polymerase zum Doppelstrang wieder ergänzt wird. Danach wird der Zyklus wiederholt bis sich genügend DNA zur Quantifizierung nach einer der unten beschriebenen Methoden gebildet hat. Im allgemeinen sind ca. 20 bis ca. 40 Zyklen, vorzugsweise ca. 30 bis ca. 35 Zyklen ausreichend.

Bei der NASBA-Methode (auch 3SR-System genannt) wird zumindest ein Oligonukleotid-Primer, vorzugsweise TM2 verwendet, der einen Promotor für die RNA Polymerase, vorzugsweise für die T7 RNA Polymerase enthält [siehe z. B. Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1874-1878 oder Kievits et al. (1991), J. Virol. Methods, 35, 273-286]. Zuerst wird, wie oben bereits näher beschrieben, die RNA mit Hilfe eines der oben beschriebenen Oligonukleotid-Primer und einer reversen Transkriptase, vorzugsweise der AMV reversen Transkriptase, in cDNA umgeschrieben. Das Reaktionsprodukt ist ein RNA:DNA-Doppelstrang, dessen RNA-Komponente anschließend mittels einer RNase, vorzugsweise der RNase H, zu einem DNA-Einzelstrang abgebaut wird. Unter Verwendung eines der oben beschriebenen Oligonukleotid-Primer wird der DNA-Einzelstrang mittels einer DNA Polymerase zum DNA-Doppelstrang ergänzt. Als DNA Polymerase eignet sich vorzugsweise wiederum die AMV reverse Transkriptase, da diese Transkriptase nicht nur eine RNA-abhängige DNA Polymeraseaktivität, sondern auch eine DNA-abhängige DNA Polymeraseaktivität besitzt. Das Reaktionsprodukt ist ein DNA-Doppelstrang, der den Promotor für z. B. die T7 RNA Polymerase enthält. Anschließend synthetisiert die RNA Polymerase wieder einen sogenannten "antisense" RNA-Strang und der Zyklus kann von neuem beginnen. Im allgemeinen sind ca. 20 bis ca. 40 Zyklen, vorzugsweise ca. 30 bis ca. 35 Zyklen ausreichend, um genügend Amplifikationsprodukt, vorzugsweise "antisense" RNA, für die anschließende Quantifizierung zu liefern.

Für die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte können diese beispielsweise mit Ethidiumbromid gefärbt und direkt z. B. in einem Agarose- oder Polyacrylamidgel nachgewiesen und quantifiziert werden. Es ist jedoch vorteilhaft, wenn die Amplifikationsprodukte bereits während der Amplifizierung markiert werden, weil dadurch eine höhere Sensitivität erreicht wird. Als Markierungen eignen sich beispielsweise radioaktive Markierungen, Biotinmarkierungen, Fluoreszenz- oder Elektrochemolumineszenz(ECL)markierungen. Die

Markierungen tragen in der Regel die Nukleotide als Ausgangsstoffe für die Amplifizierung durch die DNA- oder RNA-Polymerase. Die radioaktiv markierten Amplifikationsprodukte (z. B. PCR- oder NASBA-Produkte) können durch Messung der Radioaktivität, die Biotin-markierten Amplifikationsprodukte über einen Avidin- oder Streptavidin-tragenden Farbstoff, die fluoreszenzmarkierten Amplifikationsprodukte mit einem Fluorometer und die elektrochemolumineszenz-markierten Amplifikationsprodukte mit einem ECL-Detektor nachgewiesen werden. Die am meisten bevorzugte Nachweismethode ist jedoch die in vitro Hybridisierung mit einem bereits markiertem Oligonukleotid, das zu dem Amplifikationsprodukt komplementär ist. Das Oligonukleotid trägt im allgemeinen die oben beschriebenen Markierungen, wobei in Verbindung mit der NASBA-Amplifizierungsmethode die Hybridisierungsprobe eine Elektrochemolumineszenzmarkierung, vorzugsweise eine (Tris[2,2-bipyridin]ruthenium[II]-Komplexmarkierung trägt [siehe z. B. van Gemen et al. (1994), J. Virol. Methods, 49, 157-168].

Eine genaue und sensitive Quantifizierung der Amplifikationprodukte kann vorteilhafterweise dadurch erreicht werden, daß eine bestimmte Menge von einer oder mehreren bekannten Nukleinsäuren (Standard-Nukleinsäuren) co-amplifiziert werden [siehe z. B. van Gemen et al. (1993), J. Virol. Methods, 43, 177-188]. Hierbei wird zu den unbekannten Mengen der zu untersuchenden Probe eine unterschiedliche, jedoch genau bekannte Menge der co-amplifizierenden Standard-Nukleinsäure bzw. -Nukleinsäuren beispielsweise in Form einer Verdünnungsreihe hinzugegeben und die Amplifikationprodukte der Probe und einer oder mehrerer co-amplifizierender Standard-Nukleinsäuren in unabhängigen Ansätzen quantitativ bestimmt. Ein Vergleich der Meßergebnisse ergibt die Menge der zu bestimmenden RNA-Komponente der Telomerase in der Probe.

Vorteilhafterweise wird die co-amplifizierende Standard-Nukleinsäure bzw. -Nukleinsäuren mit demselben Oligonukleotid-Primer amplifiziert wie die zu untersuchende Probe und die

Amplifikationsprodukte haben auch im wesentlichen die gleiche Länge. Besonders bevorzugt haben die co-amplifizierenden Nukleinsäuren dieselbe Sequenz wie das Amplifikationsprodukt der zu bestimmenden Probe mit Ausnahme von ca. 20 Nukleinsäuren zwischen den Oligonukleotid-Primer-Bindungsstellen, die eine willkürliche, jedoch bekannte Sequenz tragen. Dadurch können das zu bestimmende Amplifikationsprodukt in der Probe von dem co-amplifizierenden Amplifikationsprodukt beispielsweise über eine Hybridisierung, wie z. B. bei Sambrook et al. (supra) näher beschrieben, mit entsprechend komplementären markierten Oligonukleotiden unabhängig voneinander quantifiziert werden. Insbesondere ist es vorteilhaft, wenn mehrere, vorzugsweise drei, verschiedene co-amplifizierende Nukleinsäuren in unterschiedlichen Konzentrationen der Probe zugesetzt werden, da hierdurch die Zahl der sonst einzeln durchzuführenden Amplifizierungsreaktionen reduziert werden kann [siehe van Gemen et al. (1994) J. Virol. Methods 49, 157-168]. Es ist auch insbesondere bevorzugt, die co-amplifizierenden Nukleinsäuren bereits zu dem oben beschriebenen RNA-Lysispuffer hinzuzugeben, da hierdurch der Einfluß möglicher Nukleinsäureverluste bei der nachfolgenden Aufarbeitung der Probe ausgeschlossen werden kann.

Als co-amplifizierende Standard-Nukleinsäuren gemäß der vorliegenden Erfindung eignen sich vorteilhafterweise RNA-Einzelstrang-Sequenzen, die durch in vitro Transkription beispielsweise mit der Sp6 oder T7 RNA Polymerase von Konstrukten hergestellt werden, die DNA oder cDNA der zu amplifizierenden Probe enthalten und die jeweils mit einem randomisierten Sequenzaustausch von beispielsweise ca. 10 bis ca. 30, vorzugsweise ca. 20 Nukleotiden ausgestattet sind.

Die Konstrukte bestehen bevorzugterweise aus einem Transkriptionsvektor mit einer Bindungsstelle für die Sp6 oder T7 RNA Polymerase zwischen einer sogenannten "Multiple Cloning Site", in welcher die DNA oder cDNA der zu amplifizierenden Probe kloniert worden ist. Durch eine selektive Hydrolyse mit

Restriktionsendonukleasen, vorzugsweise mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen, kann die klonierte Sequenz geöffnet und ein Stück einer bestimmten Länge herausgeschnitten und durch ein gleich langes Stück beispielsweise mit Hilfe der T4 Ligase ersetzt werden. Das klonierte Stück kann einen Sequenzaustausch beliebiger Länge, beispielsweise ca. 10 bis ca. 30, vorzugsweise ca. 20 Nukleinsäuren enthalten und liegt vorzugsweise zwischen den Oligonukleotid-Primer-Bindungsstellen. Diesen Vorgang kann man wiederholen, um an gleicher Stelle Insertionen mit anderen Nukleinsäure-Sequenzen vorzunehmen. Lassen sich keine geeigneten Schnittstellen finden, z. B. weil auch im Vektor geschnitten wird, müssen künstliche Schnittstellen geschaffen werden. Dies kann beispielsweise mittels rekombinanter PCR geschehen, die im wesentlichen bei Higuchi et al. [Higuchi, R. (1988). Nucleic Acid Res 16: 7351-7367; Higuchi, R. (1990). M. Innis A. et al. eds. San Diego, New York, Berkley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press, Inc. 177-183] und im experimentellen Teil der vorliegenden Erfindung beschrieben ist.

Eine bevorzugte Verwendung im Rahmen der Erfindung finden in vitro transkripierte RNA-Einzelstrang-Sequenzen von Konstrukten, welche

- a) die gesamte cDNA der RNA Komponente der menschlichen Telomerase enthalten und
- b) in welchen ein randomisierter Sequenzaustausch von ca. 20 Nukleotiden eingeführt worden ist.

Die Konstrukte sind eine Ableitung der Konstrukte

pGEM-hTR	gemäß Abb. 5a und 5b
pGEM-hTR(Ka)	gemäß Abb. 6a und 6b.

Durch in vitro Transkription der Konstrukte mit Sp6 RNA Polymerase können individuell 975 Basenpaar lange RNA-Standard-Nukleinsäuren hergestellt werden, mit der Sequenz:

(hTRKa)	gemäß Abb. 7
(hTRKb)	gemäß Abb. 8

(hTRKc) gemäß Abb. 9.

Die randomisierte Sequenz, worin sich die Standard-Nukleinsäuren von der Wildtyp-RNA voneinander unterscheiden, befindet sich bei diesem Beispiel in Position 591-610 gemäß Abb. 5a. Sie ist 20 Basenpaare lang.

Da sich die Standard-Nukleinsäuren untereinander und von der Wildtyp-Sequenz in diesem Beispiel nur durch eine randomisierte und bekannte 20 Basenpaar lange Sequenz unterscheiden, können die Amplifikationsprodukte der Standard-Nukleinsäuren und der Wildtyp-Sequenz durch komplementäre Bindung von markierten Oligonukleotiden in vier getrennten Ansätzen nachgewiesen werden. Als Oligonukleotide zum spezifischen Nachweis der amplifizierten cDNA der RNA Komponente der Telomerase (wt) und der Standard-Nukleinsäuren (hTRKa), (hTRKb) und (hTRKc) gemäß der vorliegenden Erfindung, eignen sich insbesondere folgende Sequenzen, die aus den Sequenzen gemäß Abb. 7-9 abgeleitet wurden:

5' CGACTTTGGA GGTGCCTTCA 3' O(wt)
5' AAGTCGGATC CACTTAGGTC 3' O(Ka)
5' CGCTCGATTT GGCGACGGGA 3' O(Kb)
5' GAGAGTATAG CGATTGGACG 3' O(Kc).

Zum Nachweis der amplifizierten "antisense" RNA, werden die entsprechenden reverse komplementären Sequenzen verwendet.

Danach werden die individuellen Amplifikationsmengen von Wildtyp- und den Standard-Nukleinsäuren bestimmt. Im Vergleich zu den unterschiedlichen Amplifikationsmengen der Standard-Nukleinsäuren bei bekannter Ausgangsmenge (z. B. hTRKa: 10^2 , hTRKb: 10^4 und hTRKc: 10^6 Moleküle) läßt sich die unbekannte Ausgangsmenge der Wildtypsequenz errechnen. Daraus läßt sich dann auf die Anzahl der Metastasen pro abgenommener Körperflüssigkeit schließen.

Als interne positive Kontrolle des Verfahrens und der zu untersuchenden Probe kann zusätzlich eine Nukleinsäure

amplifiziert und nachgewiesen werden, die im allgemeinen immer in einer Körperflüssigkeit vorkommt. Als geeignete Nukleinsäuren sind beispielsweise die mRNA kodierend für β -Globin oder für die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) zu nennen (siehe z. B. GB 2 260 811), die immer in den Zellen der Körperflüssigkeit vorkommen. Geeignete Oligonukleotid-Primer für die humane β -Globin mRNA sind beispielsweise Primer mit den Sequenzen:

5' ACCCAGAGGT TCTTTGAGTC 3' und

5' TCTGATAGGC AGCCTGCACT 3',

wobei die Oligonukleotid-Primer gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können.

Zur Vermeidung bzw. Reduzierung falsch positiver Ergebnisse bzw. des sogenannten Hintergrundrauschens, das durch eventuell vorhandene Telomeraseaktivitäten von Nicht-Tumorzellen verursacht wird, ist es vorteilhaft vor der erfindungsgemäßen Untersuchung die entnommene Körperflüssigkeit aufzureinigen. Insbesondere sollen aus der zu untersuchenden Probe Stammzellen und/oder aktivierte Immunzellen abgereichert oder Tumorzellen angereichert werden. Da in der Regel die einzelnen Zellen spezifische Oberflächenmarker besitzen ist eine Abtrennung oder Anreicherung der Zellen über die Immunabsorption besonders vorteilhaft. Als Methoden eignen sich beispielsweise die magnetische (MACS) oder die fluoreszenzaktivierte (FACS) Zellsortierung [siehe z. B. Göttlinger & Radbruch (1993) mta, 8, 530-536, No. 5]. So können hämatopoetische Stammzellen beispielsweise über ihren Oberflächenmarker CD34 mittels MACS von der Blutprobe abgetrennt werden [Kato & Radbruch (1993) Cytometry, 14, 384-392]. B-Zellen lassen sich beispielsweise über ihre Oberflächenmarker CD10, CD19 und/oder CD20 und T-Zellen über CD45RA und/oder CD7 abtrennen. Tumorzellen können über ihre spezifischen Tumormarker, z. B. CEA, angereichert werden. Neben MACS oder FACS eignen sich auch besonders an sogenannte käuflich erhältliche Magnetbeads (z. B. Dynabeads M450, Dynal Corp.) gebundene Antikörper gegen die spezifischen

Oberflächenmarker zur Abreicherung oder Anreicherung der entsprechenden Zellen.

Allein oder in Verbindung mit den oben beschriebenen Reinigungsverfahren ist es auch besonders vorteilhaft die Menge an RNA-Komponente der Telomerase aus venösem Blut mit der Menge an RNA-Komponente der Telomerase aus arteriellem Blut zu vergleichen, da bei venöser Blutabnahme zum Zwecke der Tumorzellbestimmung etwa nur 20% aller Zellen gegenüber 100% der Zellen bei arterieller Blutabnahme nachweisbar sind [Koop, S. et al. (1995) Cancer Res. 55, 2520-2523]. Ebenso eignet sich ein Vergleich von Blut aus der Fingerkuppe mit venösem oder arteriellem Blut.

Die quantitative Bestimmung der RNA-Komponente der Telomerase in der Probe ermöglicht es, zu bestimmen, ob Tumorzellen, insbesondere Metastasen, vor allem Mikrometastasen, von malignen Tumoren in der Körperflüssigkeit enthalten sind und in welcher Menge. Dies ist insbesondere für die frühzeitige klinische Diagnose der Metastasenbildung von malignen Tumoren und für die Überwachung einer Tumorthherapie von großem Nutzen. Als Tumorzellen können mit der vorliegenden Erfindung insbesondere Tumorzellen von Metastasen, vorzugsweise Mikrometastasen, von malignen Tumoren, vor allem Zellen metastasierender Tumore und/oder Neoplasien nachgewiesen werden, die beispielsweise von einem T-Zell-Lymphoblastom, T-Zell-Leukämiezellen, chronisch myeloische Leukämiezellen, akute lymphatische Leukämiezellen, chronisch lymphatische Leukämiezellen, Teratokarzinom, Melanom, Lungenkarzinom, Dickdarmkrebs, Brustkrebs, Leberzellkarzinom, Nierentumor, Nebennierentumor, Prostatakarzinom, Neuroblastom, Gehirntumor, kleines Lungenzellkarzinom, Rhabdomyosarkom, Leiomyosarkom und/oder Lymphom abstammen.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind die Oligonukleotid-Primer mit der Sequenz

5' GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3' (TM1),

5' CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3' (TM2),

5' ATAAGAATGC GGCCGCGGGT TGCGGAGGGT GGGCCTGGGA GGG 3' (TMK1),
5' CCCAAGCTTG TGGGGGTTAT ATCCTA 3' (TMK2),
5' CGCGGATCCA CTTAGGTCAT CGATCTGCCA ATTTGCAGCA CACT 3' (TMK3)
und/oder

5' CGCGGATCCG ACTTGGTACC ATGAATGGGC AGTGAGCCGG 3' (TMK4),
wobei TM1 und/oder TM2 gegebenenfalls zusätzlich eine
Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können;
sowie
ein Oligonukleotid mit der Sequenz

5' CCATCGATTG CCGTCGCCAA ATCGAGCGGG TACCCC 3' (Kb)
3' GGTAGCTAAG GGCAGCGGTT TAGCTCGCCC ATGGGG 5', oder

5' CCATCGATCG TCCAATCGCT ATACTCTCGG TACCCC 3' (Kc)
3' GGTAGCTAGC AGGTTAGCGA TATGAGAGCC ATGGGG 5';

sowie

ein Nukleinsäurekonstrukt pGEM-hTR gemäß Abb. 5a und 5b oder
ein Nukleinsäurekonstrukt pGEM-hTR(Ka) gemäß Abb. 6a und 6b;
sowie die RNA-Standard-Nukleinsäure zur Co-amplifikation mit
der Sequenz:

(hTRKa) gemäß Abb. 7

(hTRKb) gemäß Abb. 8

(hTRKc) gemäß Abb. 9, bzw. die cDNAs davon,

sowie die Oligonukleotide zum Nachweis der amplifizierten cDNA
der Wildtyp-Nukleinsäure und der cDNA der hTRKa-, hTRKb- und
hTRKc-Standard-Nukleinsäuren mit der Sequenz:

5' CGACTTTGGA GGTGCCTTCA 3' O(wt)

5' AAGTCGGATC CACTTAGGTC 3' O(Ka)

5' CGCTCGATTT GGCGACGGGA 3' O(Kb)

5' GAGAGTATAG CGATTGGACG 3' O(Kc)

und die entsprechenden reverse komplementären Sequenzen der
Oligonukleotide zum Nachweis der amplifizierten "antisense"
RNA.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zur
Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit,
beispielsweise Blut, Urin aber auch Stuhl, Exsudate oder

Transsudate von Körperhöhlen, insbesondere peripheres Blut, enthaltend

(a) Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuren zur Co-amplifikation, und

(b) ein Oligonukleotid-Primerpaar zur spezifischen Amplifizierung von Telomerase-kodierender Nukleinsäure und der Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuren gemäß (a), wobei vorzugsweise die RNA-Standard-Nukleinsäure zur Co-Amplifikation gemäß (a) folgende Sequenz hat oder haben:

(hTRKa) gemäß Abb. 7

(hTRKb) gemäß Abb. 8

(hTRKc) gemäß Abb. 9,

und/oder das Oligonukleotid-Primerpaar vorzugsweise folgende Sequenzen:

5' GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3' (TM1) und/oder

5' CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3' (TM2),

wobei TM1 und/oder TM2 gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können.

Der erfindungsgemäße Kit kann auch zusätzlich, wie oben näher beschrieben, ein markiertes Oligonukleotid als Hybridisierungsprobe zum spezifischen Nachweis der amplifizierten cDNA der Wildtyp-Sequenz und/oder mehrere markierte Oligonukleotide als Hybridisierungsprobe zum spezifischen Nachweis der amplifizierten cDNA der Standard-Nukleinsäure bzw. -Nukleinsäuren enthalten. Darüberhinaus kann ein erfindungsgemäßer Kit für die PCR-Amplifikation zusätzlich die oben näher beschriebenen Enzyme, gegebenenfalls markierte Nukleotide und/oder geeignete Puffer enthalten, wie z. B. eine reverse Transkriptase, vorzugsweise eine AMV reverse Transkriptase, eine DNA-Polymerase, vorzugsweise eine Taq-Polymerase und/oder eine DNase und gegebenenfalls zur Abreicherung von Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel, wie oben bereits näher beschrieben.

Ein anderer erfindungsgemäßer Kit für die NASBA-Amplifikation kann ebenso neben der oben näher beschriebenen Standard-

Nukleinsäuren ein markiertes Oligonukleotid als Hybridisierungsprobe zum spezifischen Nachweis der amplifizierten "antisense" RNA der Wildtyp-Sequenz und/oder mehrere markierte Oligonukleotide als Hybridisierungsprobe zum spezifischen Nachweis der amplifizierten "antisense" RNA der Standard-Nukleinsäure bzw. -Nukleinsäuren enthalten. Zusätzlich kann er ebenso die oben näher beschriebenen Enzyme, gegebenenfalls markierte Nukleotide und/oder geeignete Puffer, wie z. B. eine reverse Transkriptase, vorzugsweise eine AMV reverse Transkriptase, eine RNA-Polymerase, vorzugsweise eine T7 RNA-Polymerase, eine RNase H und/oder eine DNase enthalten, und gegebenenfalls zur Abreicherung von Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel, wie oben bereits näher beschrieben.

Die folgenden Beispiele und Figuren sollen die vorliegende Erfindung näher beschreiben, ohne sie jedoch darauf zu beschränken.

Beschreibung der Figuren

Abb. 1 zeigt die RNA-Komponente der menschlichen Telomerase und die Position der entworfenen Oligonukleotid-Primer: 5'-Primer TM1 (Position 428-452) und 3'-Primer TM2 (Position 728-754) mit einem Amplifikationsprodukt von 327 Basenpaaren (bp) oder 5'-Primer TMK1 ([16 bp] + 1-27) und 3'-Primer TMK2 (Position 940-962 + [3 bp]) mit einem Amplifikationsprodukt von 981 bp. Eine Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen NotI und HindIII ergibt das 962 bp Fragment hTR.

Abb. 2 zeigt eine PCR-Amplifikation an der cDNA von Tumorzelllinien.

Banden 1: MT4, T-Zell-Lymphoblast-Zelllinie, Banden 2: C8166, T-Zell-Leukämie-Zelllinie, Banden 3: K562, Chronische Myeloische Leukämie- (CML-) Zelllinie, Banden 4: Molt4, Akute Lymphatische Leukämie- (ALL-) Zelllinie und Banden 5:

Teratokarzinom-Zelllinie; M: 100bp-Marker. hTR: RT-PCR mit den TM1- und TM2-Primern; hTR/ Φ RT: PCR-Kontrollreaktion ohne reverse Transkriptions(RT)-Reaktion, GAPDH: RT-PCR-Kontrollreaktion mit Primern für die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH).

Abb. 3 zeigt eine PCR-Amplifikation mit den TM1- und TM2-Primern an der cDNA von Tumor- und gesunden Referenzgeweben. M: 100bp-Marker; Bande 1: Nieren-Karzinom, Bande 2: gesundes Nierengewebe; Bande 3: Schilddrüsen-Karzinom, Bande 4: gesundes Schilddrüsengewebe; Bande 5: Mamma-Karzinom, gesundes Brustgewebe; Bande 7: Colon-Karzinom, Bande 8: gesundes Dickdarmgewebe; Bande 9: H₂O-Kontrollreaktion.

Abb. 4 zeigt eine PCR-Amplifikation mit den TM1- und TM2-Primern an der cDNA von peripherem Blut von normalen Probanden und Leukämiepatienten.

M: 100bp-Marker; Banden 1-3: gesunde Blutspender; Banden 4-8: Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML); Bande 9: H₂O-Kontrollreaktion.

Abb. 5a und 5b zeigen das Konstrukt pGEM-hTR (4118 bp) mit dem Transkriptionsvektor pGEM-13Zf(+) und dem Fragment hTR(NotI/HindIII) gemäß Abb. 1, das die cDNA der RNA Komponente der menschlichen Telomerase (Basen 1-956: Position 12-975) enthält. Die Position der NotI-Addition (Position: 12-17) durch den Oligonukleotid-Primer TMK1 ist gepunktet gezeichnet.

Abb. 6a und 6b zeigen das Konstrukt pGEM-hTR(Ka) (4118 bp) mit der ClaI-BamHI-KpnI-Kassette (Position: 585-616) und die Positionen der entworfenen Oligonukleotid-Primer (5'-Primer TMK1: Position [16 bp] + 1-27, 3'-Primer TMK3: Position 565-605 + [24 bp]) mit einem Amplifikationsprodukt von 606 bp, (5'-Primer TMK4: Position 601-636 + [20 bp], 3'-Primer TMK2: Position 940-962 + [3 bp]) mit einem Amplifikationsprodukt von 387 bp. Eine Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen NotI

387 bp. Eine Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen NotI und BamHI bzw. BamHI und HindIII ergeben ein Produkt von 588 bzw. 375 bp. Die Ligierung der Fragmente in pGEM-13Zf(+) ergibt ein Produkt von 963 bp.

Abb. 7 zeigt die Standard-RNA hTRKa (975 bp) nach der in vitro Transkription mit Sp6 RNA Polymerase an dem mit HindIII linearisierten Konstrukt pGEM-hTRKa und die Position der randomisierten Sequenz von 20 bp (Position 591-610).

Abb. 8 zeigt die Standard-RNA hTRKb (975 bp) nach der in vitro Transkription mit Sp6 RNA Polymerase an dem mit HindIII linearisierten Konstrukt pGEM-hTRKb und die Position der randomisierten Sequenz von 20 bp (Position 591-610).

Abb. 9 zeigt die Standard-RNA hTRKc (975 bp) nach der in vitro Transkription mit Sp6 RNA Polymerase an dem mit HindIII linearisierten Konstrukt pGEM-hTRKc und die Position der randomisierten Sequenz von 20 bp (Position 591-610).

BEISPIELE

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die folgenden Beispiele nach Standardverfahren, wie z. B. bei Sambrook, J. et al. (1989) supra beschrieben, oder nach den Herstellerangaben der verwendeten Kits bzw. Enzyme durchgeführt.

1. Kultivierung und Isolierung von peripherem Blut, Gewebe und Zellen

Tumorzelllinien wie MT4 (T-Zell-Lymphoblast), C8166 (T-Zell-Leukämie), K562 (Chronisch Myeloische Leukämie (CML)), Molt4 (Akute Lymphatische Leukämie (ALL)) und Teratokarzinom wurden gemäß den Vorgaben der ATCC (American Tissue Culture Collection), in Kultur genommen. Venöses Spenderblut von Leukämiepatienten (akute myeloische Leukämie) und gesunden

Kontrollpersonen wurde mittels Punktion einer Unterarmvene in EDTA-Monovetten[®] (Saarsted) abgenommen. Menschliches Tumor- und gesundes Referenzgewebe wurden nach Entnahme direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2. Isolierung von zellulärer RNA

Die Isolierung von totaler zellulärer RNA erfolgte nach Standardverfahren [Chomczynski et al. (1987) Anal Biochem 162, 156; Sambrook, J. et al. (1989). Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Peripheres Blut wurde sofort nach Abnahme in RNA-Lysispuffer (4 M Guanidinium Isothiocyanat; 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1% Mercaptoethanol) überführt. Gewebe und Zellen wurden mit einem Dispergiergerät Ultra-Turrax T25 (Laborreaktor-Systeme, IKA) in RNA-Lysisbuffer homogenisiert. Die Gemische wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -70°C gelagert.

3. Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde mit dem GeneAmp[®] RNA-PCR-Kit (Perkin Elmer) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Aliquote der isolierten totalen RNA von peripherem Blut, Zelllinien und Geweben wurden jeweils zuvor mit 20U DNase (Boehringer, Mannheim) in 10 µl Ansätzen (in 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 und 2.5 mM MgCl₂) bei 37°C für 60 Minuten hydrolysiert und anschließend die DNase für 30 Minuten bei 95°C inaktiviert. Zur vollständigen Aufreinigung der RNA von Proteinen und DNA-Fragmenten wurden die DNase-Hydrolysate jeweils über eine Kieselgelmatrix (RNeasy[®], Qiagen) erneut aufgereinigt und photometrisch gemessen.

Die beiden Oligonukleotid-Primer:

TM1 5' GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3'

TM2 5' CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3'

wurden nach der von Feng et al. veröffentlichten Sequenz der RNA-Komponente der menschlichen Telomerase (Feng, J. et al. (1995). Science 269: 1236-41) entworfen (Abb. 1) und mit einem Applied Biosystem 380A Synthesizer synthetisiert. Die Spezifität der TM1- und TM2-Primer wurde mittels Computer gestützter Homologieanalyse an den Nukleinsäuresequenzen in den GenBank-, EMBL-, DDBJ- und PDB-Datenbanken mittels BLASTN 1.4.9 MP [Altschul, S. F. et al. (1990). J Mol Biol 215: 403-410] überprüft.

Zur Abstimmung der Amplifikationsmengen wurden für jedes Experiment gleiche RNA-Mengen für die RT-Reaktion eingesetzt. Um eine Kontamination der RNA Präparationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde jede mit DNase hydrolysierte RNA-haltige Probe zuerst der unten beschriebenen PCR unterzogen und auf Amplifikation hin überprüft. Die RNA-haltige Probe, bei der kein Amplifikationsprodukt nachweisbar war, wurde für die folgenden cDNA-Synthese- und PCR-Schritte eingesetzt. Als interne Standardkontrolle wurden Oligonukleotid-Primer für die GAPDH eingesetzt.

Die PCR wurde an 5 µl der cDNA-Reaktion bzw. an einer 1:50 Verdünnung der gewonnenen Plasmid-DNA nach folgendem Programm durchgeführt: (95°C: 2 Minuten, vorwärmen); (94°C: 30 Sekunden, 60°C: 30 Sekunden, 72°C: 30 Sekunden, 35 Zyklen); (72°C: 7 Minuten, finale Extension). Die Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch auf 1.5%igem TAE Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht visualisiert und fotodokumentiert (siehe Abb. 2-4).

4. Herstellung der RNA-Standard-Nukleinsäuren hTRKa, hTRKb und hTRKc

Die verwendeten Enzyme, wie Sp6 RNA Polymerase, T4 Ligase bzw. Restriktionsendonukleasen u.a. von Boehringer Mannheim, Biolabs bzw. Promega wurden nach Herstellervorgaben verwendet. Die zur Klonierung bestimmten PCR-Amplifikationsprodukte

wurden gelelektrophoretisch auf 1.5% TAE Agarose aufgetrennt und eluiert (Qiagen). Die Aufreinigung der Restriktionshydrolysate geschah durch Phenol-Chlorophorm-Extraktion und Fällung in Salz und Ethanol oder durch DNS-Reinigung (Qiagen). Die Konstrukte wurden durch Ligierung der Fragmente in die korrespondierenden Schnittstellen des Klonierungs- und Transkriptionsvektors pGEM-13Zf(+) mit Hilfe der T4 Ligase kloniert. Dieser Vektor erlaubt die in vitro Transkription von klonierten Fragmenten durch den wahlweisen Einsatz von Sp6- oder T7 RNA Polymerasen. Kompetente Bakterien (XL-1Blue, Stratagen) wurden mittels Elektroporation (BioRad) transformiert. Plasmid DNA wurde mittels Plasmid Reinigungs Kits (Qiagen) gereinigt. Positive Klone wurden unter Verwendung von vektor- oder sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primern mit der PCR validiert. Eine Sequenzvalidierung der Konstrukte erfolgte durch semiautomatische Sequenzanalyse.

Das Konstrukt pGEM-hTR (Abb. 5a und 5b) wurde als Ausgangskonstrukt für die Konstrukte pGEM-hTR(Ka) (Abb. 6a und 6b), pGEM-hTR(Kb) und pGEM-hTR(Kc) geschaffen. pGEM-hTR(Ka) unterscheidet sich von pGEM-hTR durch einen randomisierten Sequenzaustausch in Position 585-616. Die Konstrukte pGEM-hTRKb und pGEM-hTRKc unterscheiden sich von pGEM-hTR durch einen randomisierten Sequenzaustausch in Position 587-615. Die Konstrukte wurden zur in vitro Transkription mit Sp6 RNA Polymerase der Standard-RNA: hTRKa (Abb. 7), hTR Kb (Abb. 8) und hTRKc (Abb. 9), verwendet. Zur Bildung des Konstrukts pGEM-hTR wurde die cDNA der RNA Komponente der menschlichen Telomerase hTR (Abb. 1) in die NotI und HindIII-Schnittstellen von pGEM-13Zf(+) kloniert. Dies wurde dadurch erreicht, daß mit den folgenden Oligonukleotid-Primern die aus der Sequenz hTR (Abb. 1) abgeleitet wurden

5' ATAAGAATGC GGCCGCGGGT TGCGGAGGGT GGCCTGGGA GGG 3' (TMK1)

5' CCCAAGCTTG TGGGGGTTAT ATCCTA 3' (TMK2)

eine RT-PCR an der bereits gewonnenen RNA aus Tumorzellen oder -linien unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt wurde. Der Oligonukleotid-Primer TMK1 (Position 1-27, Abb.1)

enthält 5' zusätzlich eine Verlängerung von 16 bp und eine NotI-Schnittstelle, der Oligonukleotid-Primer TMK2 (Position 940-962, Abb.1) zusätzlich eine Verlängerung von 3 bp und eine HindIII-Schnittstelle. Das Primerpaar TMK1 und TMK2 amplifiziert ein 979 bp Fragment. Nach einer Restriktionshydrolyse mit NotI und HindIII wurde das 963 bp Fragment hTR(NotI-HindIII) (Position 1-957, Abb. 5) in die korrespondierenden Schnittstellen (Position 12 bzw. 38) von pGEM-13Zf(+) kloniert und das 4118 bp Konstrukt pGEM-hTR geschaffen. Die Konstruktion von pGEM-hTR(Ka) wurde dadurch erreicht, daß im Konstrukt pGEM-hTR (Position 585-616) eine 32 bp Sequenz mit einer 32 bp ClaI-BamHI-KpnI-Kassette:

5' ATCGATGACC TAAGTGGATC CGACTTGCTA CC 3'

3' TAGCTACTGG ATTCACCTAG GCTGAACCAT GG 5'

ausgetauscht wurde. Dieser Austausch wurde durch rekombinante PCR durchgeführt und ist eine Abwandlung der von Higuchi et al. beschriebenen Verfahren [Higuchi, R. (1988). Nucleic Acid Res 16: 7351-7367; Higuchi, R. (1990). M. Innis A. et al. eds. San Diego, New York, Berkley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press, Inc. 177-183]. In einem ersten Schritt wurden zwei unabhängige PCR-Reaktionen an pGEM-hTR durchgeführt:

Die 1. PCR-Reaktion erfolgte mit den folgenden Oligonukleotid-Primern, die aus der Sequenz hTR (Abb. 1) abgeleitet wurden:

5' ATAAGAATGC GGCCGCGGGT TGCGGAGGGT GGGCCTGGGA GGG 3' (TMK1)

5' CGCGGATCCA CTTAGGTCAT CGATCTGCCA ATTTGCAGCA CACT 3' (TMK3)

Der Oligonukleotid-Primer TMK3 (Position 565-605, Abb. 6) enthält 5' zusätzlich eine Verlängerung von 24 bp mit einer BamHI- und ClaI-Schnittstelle und kodiert 21 bp der ClaI-BamHI-KpnI-Kassette. Das Amplifikat aus der 1. PCR-Reaktion ergibt das 5' Fragment von 606 bp und wurde mit NotI und BamHI zu einem 588 bp 5'-Fragment verdaut.

Die 2. PCR-Reaktion erfolgte mit den folgenden Oligonukleotid-Primern, die aus der Sequenz hTR (Abb. 1) abgeleitet wurden:

5' CGCGGATCCG ACTTGGTACC ATGAATGGGC AGTGAGCCGG 3' (TMK4)

5' CCCAAGCTTG TGGGGGTTAT ATCCTA 3' (TMK2).

Der Oligonukleotid-Primer TMK4 (Position 599-618, Abb 6) enthält 5' zusätzlich eine Verlängerung von 20 bp mit einer BamHI- und KpnI-Schnittstelle und kodiert 17 bp der ClaI-BamHI-KpnI-Kassette. Das Amplifikat aus der 2. PCR-Reaktion ergibt das 3' Fragment von 387 bp und wurde mit BamHI und HindIII zu einem 375 bp 3'-Fragment hydrolysiert. Mit T4 Ligase wurden die BamHI-Schnittstellen der 5'- und 3'-Fragmente miteinander zu dem 963 bp NotI-HindIII-Fragment verbunden, in die korrespondierenden Schnittstellen (Position 12 bzw. 38) von pGEM-13Zf(+) kloniert und das 4118 bp Konstrukt pGEM-hTR(Ka) geschaffen (Abb. 6). Die Konstruktion von pGEM-hTR(Kb) und pGEM-hTR(Kc) wurde dadurch erreicht, daß eine 29 bp Sequenz im Konstrukt pGEM-hTR(Ka) (Position 587-615) mit einer randomisierten Sequenz von 29 bp ausgetauscht wurde. Nach einem selektiven Restriktionsverdau mit ClaI und KpnI an dem Konstrukt pGEM-hTR(Ka) und den nachfolgenden Oligonukleotiden Kb und Kc

ClaI	KpnI	
5' CCATCGATTC CCGTCGCCAA ATCGAGCGGG TACCCC 3'		Kb
3' GGTAGCTAAG GGCAGCGGTT TAGCTCGCCC ATGGGG 5'		

ClaI	KpnI	
5' CCATCGATCG TCCAATCGCT ATACTCTCGG TACCCC 3'		Kc
3' GGTAGCTAGC AGGTTAGCGA TATGAGAGCC ATGGGG 5'		

wurden in zwei getrennten T4 Ligase-Reaktionen das ClaI-KpnI-Fragment der Oligonukleotide Kb und Kc in die korrespondierenden Schnittstellen von pGEM-hTR(Ka) kloniert und die 4118 bp Konstrukte pGEM-hTR(Kb) und pGEM-hTR(Kc) geschaffen.

In vitro RNA wurde mit Sp6 RNA Polymerase von pGEM-hTR(Ka) (hTRKa, Abb 7), pGEM-hTR(Kb) (hTRKb, Abb 8), und pGEM-hTR(Kc) (hTRKc, Abb 9) in einer Länge von 975 bp geschaffen. Die weitere Aufbereitung der RNA, wie DNase Verdau, Reinigung und Kalibrierung erfolgte nach Standardmethoden.

5. Ergebnisse

Die Untersuchungen an Tumorzelllinien ergaben, daß die RNA-Komponente der menschlichen Telomerase in unterschiedlichen Mengen in allen Tumorzelllinien bei gleicher Amplifikationsmenge der GAPDH-Kontrollreaktion nachweisbar war (Abb. 2). Eine Kontamination mit genomischer DNA konnte durch Kontrollreaktion ohne Zugabe von reverser Transkriptase jeweils ausgeschlossen werden.

Die vergleichenden Untersuchungen an Tumorgewebe und gesundem Gewebe ergaben, daß die RNA-Komponente der menschlichen Telomerase eindeutig in Tumorgeweben jedoch nicht in gesunden Referenzgeweben nachgewiesen werden konnte (Abb.3). Die unterschiedliche Intensität der Amplifikationsprodukte kann mit der individuellen Güte der gewonnenen RNA aus den Tumorgeweben erklärt werden.

Die Untersuchungen mit venösem Blut ergaben, daß im Blut gesunder Probanden und von Leukämiepatienten unterschiedlich hohe Telomeraseaktivitäten nachgewiesen werden konnte, wobei im Vergleich zu den Krebspatienten bei den Kontrollpersonen deutlich weniger Telomeraseaktivitäten gefunden wurde (Abb. 4).

Die in vitro Transkription mittels Sp6 RNA Polymerase an den Konstrukten pGEM-hTR(Ka), pGEM-hTR(Kb) und pGEM-hTR(Kc) ergab jeweils das gewünschte RNA-Transkript hTRKa, hTRKb und hTRKc mit einer Länge von 975 Basen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, dadurch gekennzeichnet, daß
(a) mit der zu untersuchenden Probe eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die RNA-Komponente der Telomerase spezifisch amplifiziert wird, und
(b) die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Amplifizierungsreaktion mit der zu untersuchenden Probe eine reverse Transkriptionsreaktion durchgeführt wird, bei der die in der Probe enthaltene RNA in cDNA umgeschrieben wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß mit der zu untersuchenden Probe vor der Umschreibung der RNA in cDNA eine DNase-Reaktion durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Probe vorzugsweise über eine Ionenaustauschchromatographie, insbesondere über Kieselgel gereinigt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß zur quantitativen Bestimmung der Telomerase-kodierenden Nukleinsäure mindestens eine, vorzugsweise drei Standard-Nukleinsäuren co-amplifiziert werden, die in unterschiedlichen Konzentrationen zu der zu untersuchenden Probe dazugegeben werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die co-amplifizierende(n) Standard-Nukleinsäure(n) die Sequenz gemäß Abb. 7, 8 und/oder 9 besitzen.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifizierungsprodukt entweder direkt oder über eine Markierung vorzugsweise über eine radioaktive Markierung, eine Biotin-Markierung, eine Fluoreszenz-Markierung oder eine Elektrochemolumineszenz-Markierung quantifiziert wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifizierungsprodukt über eine Hybridisierung mit einem markierten Oligonukleotid nachgewiesen wird, wobei die Markierung vorzugsweise eine radioaktive Markierung, eine Biotin-Markierung, eine Fluoreszenz-Markierung oder eine Elektrochemolumineszenz-Markierung ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5-8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Quantifizierung der zu bestimmenden Telomerase-kodierenden Nukleinsäure die Menge der co-amplifizierten Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuren mit der Menge der Telomerase-kodierenden Nukleinsäure verglichen wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um peripheres Blut handelt, und daß als positive Kontrolle mit der zu untersuchenden Probe eine Reaktion durchgeführt wird, bei der eine im peripheren Blut vorkommende Nukleinsäure, vorzugsweise die mRNA kodierend für β -Globin oder Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, spezifisch amplifiziert und nachgewiesen wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1 oder nach einem der Ansprüche 3-10, dadurch gekennzeichnet, daß als negative Kontrollen vor der Amplifizierungsreaktion mit der zu untersuchenden Probe keine reverse Transkriptionsreaktion durchgeführt wird und/oder anstelle der Körperflüssigkeit Wasser eingesetzt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß zur Amplifizierung folgende Oligonukleotid-Primer verwendet werden:
5' GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3' (TM1) und/oder
5' CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3' (TM2),
wobei TM1 und/oder TM2 gegebenenfalls eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthält.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12, durch gekennzeichnet, daß zur Amplifizierung eine DNA-Polymerase oder eine RNA-Polymerase verwendet wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle der Amplifizierung mit der DNA-Polymerase die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und im Falle der Amplifizierung mit der RNA-Polymerase die isothermale Nukleinsäuresequenz-basierende Amplifikation (NASBA) durchgeführt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß aus der zu untersuchenden Blutprobe Stammzellen und/oder aktivierte Immunzellen vorzugsweise mittels Immunabsorption angereichert werden.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß aus der zu untersuchenden Blutprobe die Tumorzellen vorzugsweise mittels Immunabsorption angereichert werden.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß bei dem genannten Verfahren zum einen eine venöse Blutprobe und zum anderen eine arterielle Blutprobe untersucht wird und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß bei dem genannten Verfahren zum einen eine Blutprobe aus der Fingerkuppe und zum anderen eine venöse oder arterielle Blutprobe untersucht wird und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen von Metastasen, vorzugsweise Mikrometastasen, von malignen Tumoren stammen.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen aus einer Gruppe von Zellen metastasierender Tumoren und/oder Neoplasien ausgewählt werden, die von einem T-Zell-Lymphoblastom, T-Zell-Leukämiezellen, chronisch myeloische Leukämiezellen, akute lymphatische Leukämiezellen, chronisch lymphatische Leukämiezellen, Teratokarzinom, Melanom, Lungenkarzinom, Dickdarmkrebs, Brustkrebs, Leberzellkarzinom, Nierentumor, Nebennierentumor, Prostatakarzinom, Neuroblastom, Gehirntumor, Rhabdomyosarkom, Leiomyosarkom und/oder Lymphom abstammen.
21. Oligonukleotid-Primer mit der Sequenz
5' GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3' (TM1);
5' CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3' (TM2);
5' ATAAGAATGC GGCCGCGGGT TGCGGAGGGT GGGCCTGGGA GGG 3' (TMK1);
5' CCCAAGCTTG TGGGGGTTAT ATCCTA 3' (TMK2);
5' CGCGGATCCA CTTAGGTCAT CGATCTGCCA ATTTGCAGCA CACT 3' (TMK3); und/oder
5' CGCGGATCCG ACTTGGTACC ATGAATGGGC AGTGAGCCGG 3' (TMK4).

22. Oligonukleotid mit der Sequenz
5' CCATCGATTC CCGTCGCCAA ATCGAGCGGG TACCCC 3' (Kb)
3' GGTAGCTAAG GGCAGCGGTT TAGCTCGCCC ATGGGG 5', und/oder

5' CCATCGATCG TCCAATCGCT ATACTCTCGG TACCCC 3' (Kc)
3' GGTAGCTAGC AGGTTAGCGA TATGAGAGCC ATGGGG 5'.
23. Standard-Nukleinsäure zur Co-amplifikation mit der Sequenz gemäß Abb. 7, 8 oder 9, oder die entsprechende cDNA davon.
24. Nukleinsäurekonstrukt pGEM-hTR gemäß Abb. 5a und 5b.
25. Nukleinsäurekonstrukt pGEM-hTR(Ka) gemäß Abb. 6a und 6b.
26. Kit zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit enthaltend
(a) Standard-Nukleinsäure bzw. Standard-Nukleinsäuren zur Co-amplifikation, und
(b) ein Oligonukleotid-Primerpaar zur spezifischen Amplifizierung von Telomerase-kodierender Nukleinsäure und der Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuren gemäß (a).
27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Standard-Nukleinsäure bzw. Standard-Nukleinsäuren gemäß (a) eine Sequenz gemäß Abb. 7, 8 und/oder 9 hat bzw. haben.
28. Kit nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid-Primerpaar gemäß (b) folgende Sequenzen hat:
5' GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3' (TM1) und
5' CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3' (TM2),
wobei TM1 und/oder TM2 gegebenenfalls eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthält.
29. Kit nach einem der Ansprüche 26-28, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich ein markiertes

Oligonukleotid zum Nachweis der amplifizierten Nukleinsäure der zu bestimmenden Probe und/oder ein oder mehrere markierte Oligonukleotide zum Nachweis der co-amplifizierten Standard-Nukleinsäure bzw Standard-Nukleinsäuren enthält, insbesondere die Oligonukleotide mit den Sequenzen:

5' CGACTTTGGA GGTGCCTTCA 3' O(wt)

5' AAGTCGGATC CACTTAGGTC 3' O(Ka)

5' CGCTCGATTT GGCGACGGGA 3' O(Kb)

5' GAGAGTATAG CGATTGGACG 3' O(Kc),

und die entsprechenden reverse komplementären Sequenzen davon.

30. Kit nach einem der Ansprüche 26-29, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich eine reverse Transkriptase, eine DNA-Polymerase, vorzugsweise eine Taq-Polymerase, eine DNase und/oder geeignete Puffer und gegebenenfalls markierte Nukleotide und gegebenenfalls zur Abreicherung von Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel enthält.
31. Kit nach einem der Ansprüche 26-29, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich eine reverse Transkriptase, eine RNA-Polymerase, vorzugsweise eine T7 RNA-Polymerase, eine RNase H, eine DNase und/oder geeignete Puffer und gegebenenfalls markierte Nukleotide und gegebenenfalls zur Abreicherung von Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel enthält.

1/15

hTR

1 GGGTGCGGA GGGTGGGCCT GGGAGGGGTG GTGGCCATTT TTTGCTAAC
 51 CCTAACTGAG AAGGCGTAG GCGCCGTGCT TTTGCTCCCC GCGCGTGT
 101 TTTCTCGCTG ACTTTCAGCG GCGGAAAAG CCTCGGCTG CCGCCCTTCCA
 151 CCGTTCATTT TAGAGCAAAC AAAAATGTC AGCTGCTGGC CCGTTTCGCCT
 201 CCCGGGACC TGCGGCGGGT CGCCTGCCCA GCCCCCGAAC CCCGCCTGGA
 251 GCCGCGGTG GCCCCGGGCT TCTCCGGAGG CACCCACTGC CACCGCGAAG
 301 AGTTGGGCTC TGTCAGCCGC GGTCTCTCG GGGCGAGGG CGAGGTTAC
 351 CGTTTCAGGC CGCAGGAAGA GGAACGGAGC GAGTCCCGCC GCGCGCGGAT
 401 TCCCTGAGCT GTGGGACGTG CACCCAGGAC TCGGCTACA CATGCAGTTC
 451 GCTTTCCCTGT TGGTGGGGG AACGCCGATC GTGCGCATCC GTCACCCCTC
 501 GCCGGCAGTG GGGCTTGTG AACCCCAA CCTGACTGAC TGGGCCAGTG
 551 TGCTGCAAAT TGGCAGGAGA CGTGAAGCA CCTCCAAAGT CGGCCAAAAT
 601 GAATGGGCAG TGAGCCGGGG TTGCCCTGGAG CCGTTCTCTC GTGGGTTCTC
 651 CCGTCTTCCG CTTTTGTG CCTTTATGG TTGTATTACA ACTTAGTTCC
 701 TGCTCTGCAG ATTTTGTGA GGTTTGTGCT TCTCCCCAAGG TAGATCTCGA
 751 CCAGTCCCTC AACGGGGTGT GGGAGAACA GTCATTTT TTTGAGAGAT
 801 CATTTAACAT TTAAATGAATA TTTAATTAGA AGATCTAAAT GAACATTGGA
 851 AATTGTGTTT CTTTAATGGT CATCGGTTA TGCCAGAGGT TAGAAGTTTC
 901 TTTTTTTGAAA AATTAGACCT TGGCGATGAC CTTGAGCAGT AGGATATAAC
 951 CCCCACAAGC TT

Abb. 1

hTR					hTR/φRT					GAPDH						
1	2	3	4	5	M	1	2	3	4	5	M	1	2	3	4	5



Abb. 2

NI 1 2 3 4 5 6 7 8 9

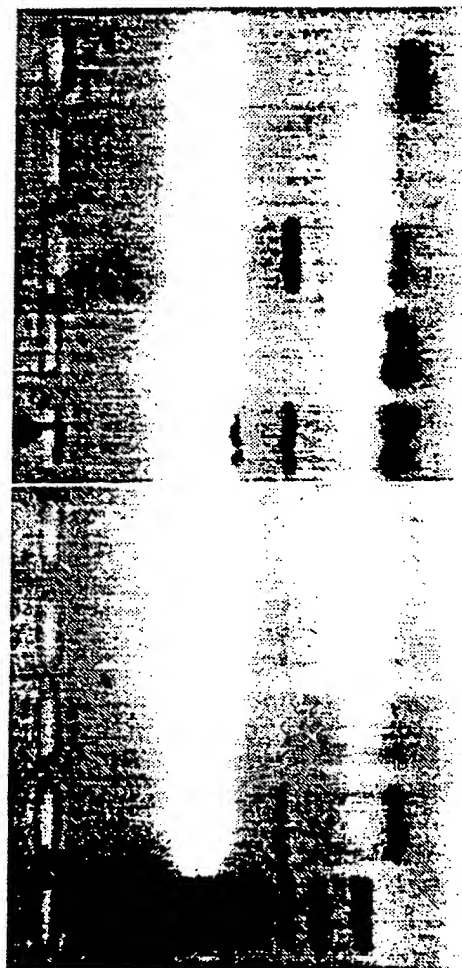


Abb. 3

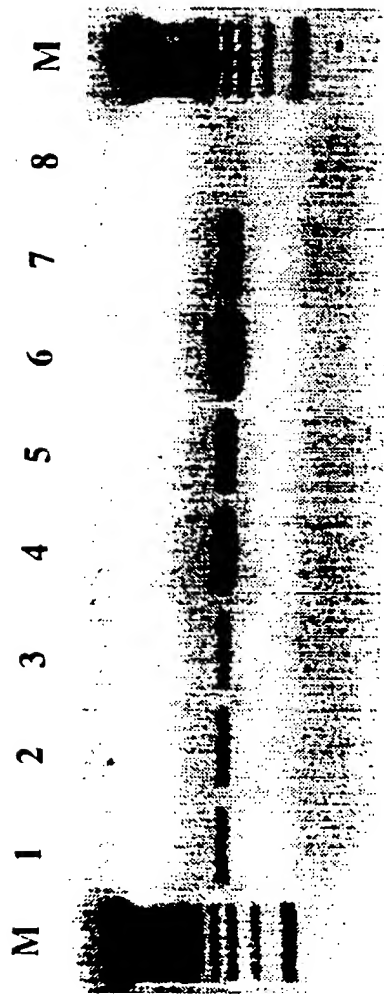


Abb. 4

5/15

pGEM-hTR

1 GGGCGAATTG GCGGCCGCGG GTTCCGGAGG GTGGGCCTGG GAGGGGTGGT
 51 GGCCATTTT TTGCTTAACCC TAACTGAGAA GGCCTAGGC GCCGTGCTTT
 101 TGCTCCCGCG GCGCTGTTTT TCTCGCTGAC TTTCAGCGGG CGGAAAAGCC
 151 TCGGCCCTGCC GCCTTCCACC GTTCATTCTA GAGCAACAA AAAATGTCAG
 201 CTGCTGGCCC GTTCGCCCTCC CGGGACCTG CGCGGGTCC CCGTCCCCAGC
 251 CCCCAGAACCC CGCCTGGAGC CGCGGTCTCG TCAGCCCGCG TCCGGAGGCA
 301 CCCACTGCCA CCGCGAAGAG TTGGGCTCTG CAGGAAAGG CACGGAGCGA
 351 GGCGAGGGCG AGGTTCACCG GTTCAGGCTGT GGGACGTGCA CCAGGACTC
 401 GTCCCGCCCGG GCGCGGATTC TGCAGTTCGC TTTCCTGTTG GTGGGGGAA
 451 GGCTCACACA CACCCCTCCG CGGCAGTGGG GGCTTGTA GGCCTGAGC
 501 GCGCATCCGT TGACTGACTG GGCCAGTGTG CTGCAAAATG GCAGGAGACG
 551 TCCAAAAGTCG GCCAAAATGA ATGGCAGTG AGCCGGGGTT TTTTGTGCTT
 601 GTTCCTGCGT GGGTTCCTCC CTCTCCCGCT TTTTGTGCTT TTTTGTGCTT
 651 GTATTACAAC TTAGTTCCTG CTCGTCAGAT TTTTGTGAGG TTTTGTGCTT
 751 TCCCAAGGTA GATCTCGACC AGTCCCTCAA CCGGGGTGCG AATGAATATT
 801 CATTTTTTTT TGAGAGATCA TTTAACAATT TTAAATGGTCA TCGGTTTATG
 851 ATCTAAATGA ACATTGGAAA TTGTGTTCTT TTTTGAATAA TTAGACCTTG
 901 CCAGAGGTTA GAAGTTTCTT TTTTGAATAA CCACAAGCTT GAGTATTCTA
 951 TGAGCAGTAG GATATAACCC TAAATAGCTT GCGGTAATCA TGGTCATAGC
 1001 TAAATAGCTT GCGGTAATCA TGGTCATAGC TGTTCCTGT GTGAAATTGT

Abb. 5a

6/15

Fortsetzung Abb. 5a**pGEM-hTR**

1051	TATCCGCTCA	CAATTCCACA	CAACATACGA	GCCGGAAGCA	TAAAGTGTA
1101	AGCCTGGGGT	GCCTAATGAG	TGAGCTAACT	CACATTAATT	GCGTTGCGCT
1151	CAC TGCCCGC	TTTCCAGTCG	GGAAACCTGT	CGTGCCAGCT	GCATTAATGA
1201	ATCGGCCAAC	GCGGGGGAG	AGCGGTTTG	CGTATTGGGC	GCTCTTCCGC
1251	TTCTCTCGTC	ACTGACTCGC	TGCGCTCGGT	CGTTCGGCTG	CGCGAGCGG
1301	TATCAGCTCA	CTCAAAGGCG	GTAATACGGT	TATCCACAGA	ATCAGGGGAT
1351	AACGCAGGAA	AGAACATGTG	AGCAAAAGGC	CAGCAAAAGG	CCAGGAACCG
1401	TAAAAAGGCC	GCGTTGCTGG	CGTTTTTCCA	TAGGCTCCGC	CCCCCTGACG
1451	AGCATCACAA	AAATCGACGC	TCAAGTCAGA	GGTGGCGAAA	CCCGACAGGA
1501	CTATAAAGAT	ACCAGGCGTT	TCCCCCTGGA	AGTCCCCTCG	TGCGCTCTCC
1551	TGTTCCGACC	CTGCCGCTTA	CCGATACCT	GTCCGCCCTT	CTCCCTTCGG
1601	GAAGCGTGGC	GCTTTCAT	AGCTCACGCT	GTAGGTATCT	CAGTTCGGTG
1651	TAGGTCGTTT	GCTCCAAAGCT	GGGCTGTGTG	CACGAACCCC	CCGTTACGCC
1701	CGACCGCTGC	GCCTTATCCG	GTAACATATCG	TCTTGAGTCC	AACCCGGTAA
1751	GACACGACTT	ATCGCCACTG	GCAGCAGCCA	CTGTAACAG	GATTAGCAGA
1801	GCGAGGTATG	TAGGCGGTGC	TACAGAGTTC	TTGAAGTGGT	GGCCTAACTA
1851	CGGCTACACT	AGAAAGGACAG	TATTTGGTAT	CTCGCTCTG	CTGAAGCCAG
1901	TTACCTTCGG	AAAAGAGTT	GGTAGCTCTT	GATCCGGCAA	ACAAACCACC
1951	GCTGGTAGCG	GTGGTTTTTT	TGTTTGCAAG	CAGCAGATTA	CGCGCAGAAA
2001	AAAAGGATCT	CAAGAAGATC	CTTTGATCTT	TTCTACGGGG	TCTGACGCTC
2051	AGTGGAACGA	AAACTCACGT	TAAGGGATTT	TGGTCATGAG	ATTATCAAAA

Abb. 5a

7/15

2101	AGGATCTTTCA	CCTAGATCCT	TTTAAATTAA	AAATGAAGTT	TTAAATCAAT
2151	CTAAAGTATA	TATGAGTAAA	CTTGGTCTGA	CAGTTACCAA	TGCTTAATCA
2201	GTGAGGCACC	TATCTCAGCG	ATCTGTCTAT	TTCGTTTCATC	CATAGTTGCC
2251	TGACTCCCCG	TCGTGTAGAT	AACTACGATA	CGGAGGGCT	TACCATCTGG
2301	CCCCAGTGCT	GCAATGATAC	CGCGAGACCC	ACGCTACCCG	GCTCCAGATT
2351	TATCAGCAAT	AAACCAGCCA	GCCGGAAGGG	CCGAGCGCAG	AAGTGGTCTT
2401	GCAACTTTAT	CCGCCTCCAT	CCAGTCTATT	AATTGTTGCC	GGGAAGCTAG
2451	AGTAAGTAGT	TCGCCAGTTA	ATAGTTTGCG	CAACGTTGTT	GCCATTGCTA
2501	CAGGCATCGT	GGTGTACGC	TCGTCGTTTG	GTATGGCTTC	ATTACAGCTCC
2551	GGTTCCCAAC	GATCAAGGCG	AGTTACATGA	TCCCCCATGT	TGTGCAAAA
2601	AGCGGTTAGC	TCCTTCCGGT	CTCCGATCGT	TGTCAGAAGT	AAGTTGGCCG
2651	CAGTGTATC	ACTCATGGTT	ATGGCAGCAC	TGCATAAATC	TCTTACTGTC
2701	ATGCCATCCG	TAAGATGCTT	TTCGTGACT	GGTGAGTACT	CAACCAAGTC
2751	ATTCTGAGAA	TAGTGTATGC	GGCGACCGAG	TTGCTCTTGC	CCGGCGTCAA
2801	TACGGGATAA	TACCGCGCCA	CATAGCAGAA	CTTTAAAAGT	GCTCATCATT
2851	GGAAAACGTT	CTTCGGGGCG	AAACTCTCA	AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG
2901	ATCCAGTTTC	ATGTAACCCA	CTCGTGCACC	CAACTGATCT	TCAGCATCTT
2951	TTACTTTTAC	CAGCGTTTCT	GGGTGAGCAA	AAACAGGAAG	GCAAAAATGCC
3001	GCAAAAAAGG	GAATAAGGGC	GACACGGAAA	TGTTGAATAC	TCATACTCTT
3051	CCTTTTTCAA	TATTATTGAA	GCATTATCA	GGGTTATTGT	CTCATGAGCG
3101	GATACATATT	TGAATGTATT	TAGAAAAATA	AACAAATAGG	GGTTCCCGCG

Abb. 5b

Fortsetzung Abb. 5b

3151	ACATTTCCCC	GAAAAGTGCC	ACCTGACGTC	TAAGAAACCA	TTATTATCAT
3201	GACATTAAAC	TATAAAATA	GGCGTATCAC	GAGGCCCTTT	CGTCTCGCGC
3251	GTTTCGGTGA	TGACGGTGAA	AACCTCTGAC	ACATGCAGCT	CCCGGAGACG
3301	GTCACAGCTT	GTCGTGAAGC	GGATGCCGGG	AGCAGACAAG	CCCGTCAGGG
3351	CGCGTCAGCG	GGTGTGGCG	GGTGTGGGG	CTGGCTTAAC	TATGCCGCAT
3401	CAGAGCAGAT	TGTACTGAGA	GTGCACCATA	TGCGGTGTA	AATACCGCAC
3451	AGATGCGTAA	GGAGAAAATA	CCGCATCAGG	CGAAATTGTA	AACGTTAATA
3501	TTTTTGTTAAA	ATTCGCGTTA	AATATTGTT	AAATCAGCTC	ATTTTAAAC
3551	CAATAGGCCG	AAATCGGCAA	AATCCCCTTAT	AAATCAAAAG	AATAGACCGA
3601	GATAGGGTTG	AGTGTGTTTC	CAGTTTGGA	CAAGAGTCCA	CTATTAAAGA
3651	ACGTGGACTC	CAACGTCAAA	GGCGAAAAA	CCGTCATCA	GGCGGATGGC
3701	CCACTACGTG	AACCATCAC	CAATCAAGT	TTTTTGCGGT	CGAGGTGCCG
3751	TAAAGCTCTA	AATCGGAACC	CTAAAGGGAG	CCCCCGATT	AGAGCTTGAC
3801	GGGGAAGCC	GGCGAACGTG	GCAGAAAGG	AAGGGAAGAA	AGCGAAAGGA
3851	GCGGGCGCTA	GGCGCTGGC	AAGTGAGCG	GTCACGCTGC	GCGTAACCCAC
3901	CACACCCGCC	GCGCTTAATG	CGCCGCTACA	GGCGCGTCC	ATTCGCCATT
3951	CAGGCTGCGC	AACGTGTGGG	AAGGCGGATC	GGTGCGGGCC	TCTTCGCTAT
4001	TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGCGGATT	AAGTTGGGTA
4051	ACGCCAGGGT	TTTCCCAGTC	ACGACGTTGT	AAAACGACGG	CCAGTGAATT
4101	GTAATACGAC	TCACTATA			

Abb. 5b

pGEM-hTR (Ka)

1 GGGCGAATTG GCGCGCGCGG GTTCGGAGG GTGGGCTGG GAGGGTGGT
 51 GGCCATTTT TGTC TAAC TGAGAA GGGGTAGGC GCCGTGCTTT
 101 TGCTCCCGC GCGTGT TCTCGTGAC TTTCAGCGG CGGAAAAGCC
 151 TCGGCTGCC GCCTTCCACC GTTCATTCTA GAGCAACAA AAAATGTCAG
 201 CTGCTGGCC GTTCGCCCTCC CGGGACCTG CGCGGGTCG CCGGGCTTC TCCGGAGCA
 251 CCGCGAACC CGCTGGAGC CGCGTCGGC CCGGGCTTC TCAGCCGCG GTC TCTCGG
 301 CCGCTGCCA CCGCGAAGAG TTGGGCTCTG TCAGCCGCG CAGGAAGAG AACGGAGCA
 351 GCGAGGGC AGGTTACCG TTTCAGGCC CAGGAAGAG GAGACGTGA CCCAGGACTC
 401 GTCCCGCCG GCGCGATTG CCGAGCTGT GGGACGTGA GGGGGGAA CGCCGATCGT
 451 GGCTACACA TGCAGTTCG TTTCCTGTG GTGGGGGAA CGCCGATCGT
 501 GCGCATCCG CACCCCTCG CGCAGTGGG GGCTGTGAA CCCCCAACC
 551 TGA CTGACTG GCGCAGTGT CTGCAAAATG GCAGatcgat gacctaatg
 601 gatccgactt ggtaccATGA ATGGGCAGTG AGCCGGGGTT GCCTGGAGCC
 651 GTTCCCTGCGT GGGTCTTCCC GTCTCCGCT TTTTGTGGC TTTTATGGTT
 701 GTATTACAAC TTAGTTCCTG CTCTGCAGAT TTGTGTGAGG TTTTGTGCTTC
 751 TCCCAAGGTA GATCTCGACC AGTCCCCTCA CGGGGTGTG GAGAACAGT
 801 CATTTT TTTT TGAGAGATCA TTTAACATT TTAATAAT TAAATTAGAG
 851 ATCTAAATGA ACATTGGAA TTGTGTTCCT TTAATGGTCA TCGGTTTATG
 901 CCAGAGGTTA GAAGTTCTT TTTTGAAAA TTAGACCTTG GCGATGACCT
 951 TGAGCAGTAG GATATAACCC CCACAAGCTT GAGTATTCTA TAGTGTACCC
 1001 TAAATAGCTT GCGTAATCA TGGTCAATAGC TGTTTCCTGT GTGAAATTGT
 1051 TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACGA GCCGGAAGCA TAAAGTGTA

Abb. 6a

Fortsetzung Abb. 6a

pGEM-hTR (Ka)

1101	AGCCTGGGGT	GCCTAATGAG	TGAGCTAACT	CACATTAATT	GCGTTGCGCT
1151	CACTGCCCGC	TTTCCAGTCG	GGAAACCTGT	CGTGCCAGCT	GCAATTAATGA
1201	ATCGGCCAAC	GCGCGGGGAG	AGGCGGTTTG	CGTATTGGGC	GCTCTTCCGC
1251	TTCTCTCGCTC	ACTGACTCGC	TGCGCTCGGT	CGTTCGGCTG	CGGCGAGCGG
1301	TATCAGCTCA	CTCAAAGGCG	GTAATACGGT	TATCCACAGA	ATCAGGGGAT
1351	AACGCAGGAA	AGAACATGTG	AGCAAAAGGC	CAGCAAAAGG	CCAGGAACCG
1401	TAAAAGGCC	GCGTTGCTGG	CGTTTTCCTCA	TAGGCTCCGC	CCCCCTGACG
1451	AGCATCACAA	AAATCGACGC	TCAAGTCAGA	GGTGCGAAA	CCCGACAGGA
1501	CTATAAAGAT	ACCAGGCGTT	TCCCCCTGGA	AGCTCCCTCG	TGCGCTCTCC
1551	TGTTCCGACC	CTGCCGCTTA	CCGGATACCT	GTCCGCCCTTT	CTCCCTTCGG
1601	GAAGCGTGGC	GCTTCTCAT	AGCTCACGCT	GTAGGTATCT	CAGTTCGGTG
1651	TAGGTCGTTC	GCTCCAAGCT	GGCTGTGTG	CACGAACCCC	CCGTTACGCC
1701	CGACCGCTGC	GCCTTATCCG	GTAACATATG	TCTTGAGTCC	AACCCGGTAA
1751	GACACGACTT	ATCGCCACTG	GCAGCAGCCA	CTGGTAACAG	GATTAGCAGA
1801	GCGAGGTATG	TAGGCGGTGC	TACAGAGTTC	TTGAAGTGGT	GGCCTAACTA
1851	CGGCTACACT	AGAAAGGACAG	TATTTGGTAT	CTGCGCTCTG	CTGAAGCCAG
1901	TTACCTTCGG	AAAAGAGATT	GGTAGCTCTT	GATCCGGCAA	ACAAACCACC
1951	GCTGGTAGCG	GTGGTTTTTT	TGTTTGCAAG	CAGCAGATTA	CGCGCAGAAA
2001	AAAAGGATCT	CAAGAAGATC	CTTTGATCTT	TTCTACGGGG	TCTGACGCTC
2051	AGTGGAACGA	AAACTCACGT	TAAGGGATTT	TGGTCATGAG	ATTATCAAAA

Abb. 6a

2101	AGGATCTTCA	CCTAGATCCT	TTTAAATTAA	AAATGAAGTT	TTAAATCAAT
2151	CTAAAGTATA	TATGAGTAA	CTTGGTCTGA	CAGTTACCAA	TGCTTAAATCA
2201	GTGAGGCACC	TATCTCAGCG	ATCTGTCTAT	TTCGTTTCATC	CATAGTTGCC
2251	TGACTCCCCG	TCGTGTAGAT	AACACGATA	CGGAGGGCT	TACCATCTGG
2301	CCCCAGTCT	GCAATGATAC	CGCGAGACCC	ACGCTACCG	GCTCCAGATT
2351	TATCAGCAAT	AAACCAAGCA	GCCGGAAGG	CCGAGCGCAG	AAGTGGTCTT
2401	GCAACTTTAT	CCGCCCTCCAT	CCAGTCTATT	AATTGTTGCC	GGGAAGCTAG
2451	AGTAAGTAGT	TCGCCAGTTA	ATAGTTTGG	CAACGTTGTT	GCCATTGCTA
2501	CAGGCATCGT	GGTGTACGC	TCGTCTGTTG	GTATGGCTTC	ATTGAGCTCC
2551	GGTTCCCAAC	GATCAAGGCG	AGTTACATGA	TCCCCCATGT	TGTGCAAAA
2601	AGCGGTTAGC	TCCTTCCGGT	CTCCGATCGT	TGTCAGAAAGT	AAGTTGGCCG
2651	CAGTGTATC	ACTCATGGTT	ATGGCAGCAC	TGCATAATC	TCTTACTGTC
2701	ATGCCATCCG	TAAGATGCTT	TTCGTGACT	GGTGAGTACT	CAACCAAGTC
2751	ATTCTGAGAA	TAGTGTAATG	GGCGACCGAG	TTGCTCTTGC	CCGGCGTCAA
2801	TACGGGATAA	TACCGCGCCA	CATAGCAGAA	CTTTAAAAGT	GCTCATCATT
2851	GGAAAACGTT	CTTCGGGGCG	AAACTCTCA	AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG
2901	ATCCAGTTCG	ATGTAACCCA	CTCGTGACCC	CAACTGATCT	TCAGCATCTT
2951	TTACTTTTAC	CAGCGTTTCT	GGGTGAGCAA	AAACAGGAAG	GCAAAATGCC
3001	GCAAAAAGG	GAATAAGGGC	GACACGGAAA	TGTTGAATAC	TCATACTCTT
3051	CCTTTTTCAA	TATTATTGAA	GCAATTATCA	GGTTATTGT	CTCATGAGCG
3101	GATACATATT	TGAATGTATT	TAGAAAAATA	AACAAATAGG	GGTTCCCGCG
3151	ACATTTCCCC	GAAAAGTGCC	ACCTGACGTC	TAAGAAAACCA	TTATTATCAT

Abb. 6 b

12/15

Fortsetzung Abb. 6b

3201	GACATTAACC	TATAAAATA	GGCGTATCAC	GAGGCCCTTT	CGTCTCGCGC
3251	GTTTCGGTGA	TGACGGTGAA	AACCTCTGAC	ACATGCAGCT	CCCGGAGACG
3301	GTCACAGCTT	GTCGTAAAGC	GGATGCCGGG	AGCAGACAAG	CCCGTCAGGG
3351	CGCGTCAGCG	GGTGTGGCG	GGTGTCGGG	CTGGCTTAAC	TATGCGGCAT
3401	CAGAGCAGAT	TGTA CTGAGA	GTGCACCAT	TGCGGTGTGA	AATACCGCAC
3451	AGATCGGTAA	GGAGAAAATA	CCGCATCAGG	CGAAATTGTA	AACGTTAATA
3501	TTTGTGTTAAA	ATTCCGCTTA	AATATTGTT	AAATCAGCTC	ATTTTAAAC
3551	CAATAGGCCG	AAATCGGCAA	AATCCCTTAT	AAATCAAAAG	AATAGACCGA
3601	GATAGGGTTG	AGTGTGTTTC	CAGTTTGGAA	CAAGAGTCCA	CTATTAAAGA
3651	ACGTGGACTC	CAACGTCAAA	GGCGAAAAA	CCGTCATCA	GGCGGATGGC
3701	CCACTACGTG	AACCATCACC	CAAATCAAGT	TTTTTGCAGT	CGAGGTGCCG
3751	TAAAGCTCTA	AATCGGAACC	CTAAAGGGAG	CCCCCGATTT	AGAGCTTGAC
3801	GGGGAAGCC	GGCGAACGTG	GCGAGAAAGG	AAGGGAAGAA	AGCGAAAGGA
3851	GCGGGCGCTA	GGCGCTGGC	AAGTGTAGCG	GTACAGCTGC	GCGTAACCCAC
3901	CACACCCGCC	GCGCTTAATG	CGCCGCTACA	GGCGCGTCC	ATTCCGCCATT
3951	CAGGCTGCGC	AACTGTTGGG	AAGGGCGATC	GGTGCGGGCC	TC TTCGCTAT
4001	TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGGCGATT	AAGTTGGGTA
4051	ACGCCAGGGT	TTTCCAGTC	ACGACGTTGT	AAAACGACGG	CCAGTGAAAT
4101	GTAATACGAC	TCACTATA			

Abb. 6 b

hTRKa

1 GGGCGAAUUG GCGGCCGCGG GUUGCGGAGG GUGGGCCUGG GAGGGUGGU
 51 GGCAUUUUU UGCUAACC UACUGAGAA GGGCUAGGC GCCGUGUUU
 101 UGCUCCCGC GCGUGUUU UCUCGUGAC UUUCAGCGG CGGAAAGCC
 151 UCGGCCUGC GCCUCCACC GUUCAUUA GAGCAACAA AAAUGUCAG
 201 CUGUGGCC CUGGCCUCC CGGGACCUG CGCGGGUCG CCUGCCCAGC
 251 CCCCGAACC CGCUGGAGC CGCGUCGGC CCGGGCUUC UCCGGAGCA
 301 CCCACUGCA CCGCGAAGAG UUGGCUUCG UCAGCCGCG GUCUCUGGG
 351 GCGAGGGCG AGGUACCCG UUUCAGGCC CAGGAAGAG AACGGAGCA
 401 GUCCGCGCG GCGCGAUUC CCUGAGCUG GGGACGUGA CCCAGGACUC
 451 GGCUCACACA UGCAGUUCG UUUCUGUUG GUGGGGGAA CGCCGAUCGU
 501 GCGCAUCCGU CACCCUCCG CCGCAGUGG GGUUGUGAA CCCCACAAC
 551 UGACUGACUG GGCCAGUGUG CUGCAAUUG GCAGAUCGA GACCUAAGUG
 601 GAUCCGACUU GGUACCAUGA AUGGCAGUG AGCCGGGUU GCCUGGAGCC
 651 GUUCCUGCGU GGUUUCUCC GUCUUCGCU UUUGUUGCC UUUUAUGGU
 701 GUUUUACAC UUAGUUCUG CUCUGCAGU UUUGUUGAGG UUUGUCUUC
 751 UCCCAAGGUA GAUCUCGACC AGUCCCUCAA CCGGUGUGG GGAGAACAGU
 801 CAUUUUUUU UGAGAGAUCA UUUAACAUU AAUGAAUUA UAAUAGAAG
 851 AUCUAAUGA ACAUUGGAA UUUGUUCU UUAAGGUCA UCGGUUUAUG
 901 CCAGAGGUUA GAAGUUUCU UUUGAAAAA UUAGACCUUG CGGAUGACCU
 951 UGAGCAGUAG GAUUAACCC CCACA

Abb. 7

14/15

hTRKb

1 GGGCGAAUUG GCGCCGCGGG GUUGCGGAGG GUGGGCCUGG GAGGGUGGU
 51 GGCAUUUUU UGUCUAACCC UAACUGAGAA GGGCGUAGGC GCCGUGCUUU
 101 UGCUCCCCGC GCGCUGUUU UCUCGUGAC UUUCAGCGGG CGGAAAGCC
 151 UGGCCUGCC GCCUCCACC GUUCAUUCUA GAGCAACAA AAAUGUCAG
 201 CUGCUGGCCC GUUCGCCUCC CGGGACCUG CGCGGGUCG CCUGCCCAGC
 251 CCCCGAACCC CGCUGGAGC CGCGGUCGG CCGGGCUUC UCCGGAGCA
 301 CCCACUGCCA CCGCGAAGAG UUGGCUUCUG UCAGCCGCG GUCUCUCGG
 351 GCGAGGGCG AGGUUCACCG UUUCAGGCC CAGGAAGAG AACGGAGCA
 401 GUCCCGCCGC GCGCGAUUC CCUGAGCUG GGGACGUGCA CCCAGGACUC
 451 GGCUCACACA UGCAGUUCGC UUUCUGUUG GUGGGGGAA CGCCGAUCGU
 501 GCGCAUCCGU CACCCUCGC CGCAGUGGG GCUUGUGAA CCCCACAACC
 551 UGACUGACUG GGCCAGUGUG CUGCAAUUG GCAGAUCGAU UCCCGUCGCC
 601 AAUUCGAGCG GGUACCAUGA AUGGCGAGUG AGCCGGGUU GCCUGGAGCC
 651 GUUCCUGCGU GGUUUCUCC GUCUCCGCU UUUGUUGCC UUUAUGGUU
 701 GUUUUACAAC UUAUUUCCUG CUCUGCAGAU UUUGUUGAGG UUUUUGCUUC
 751 UCCCAAGGUA GAUCUCGACC AGUCCCUCAA CGGGUGUGG GGAGAACAGU
 801 CAUUUUUUU UGAGAGAUCA UUUAACAUU AAUGAAUUA UAAUUAAGAG
 851 AUCUAAUGA ACAUUGGAAA UUUGUUUCCU UUAUGGUCA UCGGUUUAUG
 901 CCAGAGGUUA GAUUUUCUU UUUGAAAAA UUAGACCUUG CGGAUGACCU
 951 UGAGCAGUAG GAUAUAACCC CCACA

Abb. 8

15/15

hTRKc

1 GGGCGAAUUG GCGCGCGCGG GUUGCGGAGG GUGGGCCUGG GAGGGUGGU
 51 GGCCAUUUU UGUCUAACCC UAACUGAGAA GGGGUAGGC GCCGUGCUUU
 101 UGCU'CCCCG GCGUGUUUU UCUCGUGAC UUUCAGCGG CGGAAAGCC
 151 UCGGCCUGCC GCCUCCACC GUUCAUUCUA GAGCAAACAA AAAUUGUCAG
 201 CUGCUGGCC CUGCUGGCC CCGGACCUUG CGCGGGUCG CCUGCCCAGC
 251 CCCGAACCC CGCUGGAGC CGCGUCCGC CCGGGCUUC UCCGGAGGCA
 301 CCCACUGCCA CCGCGAAGAG UUGGGUCUG UCAGCCGCG GUCUCUCGGG
 351 GCGAGGGCG AGGUACCCG UUUCAGGCG CAGGAAGAG AACGGAGCGA
 401 GUCCCGCCG GCGCGAUUC CCUGAGCUG GGCACGUGA CCCAGGACUC
 451 GGCUCACACA UGCAGUUCG UUUCUUGUG GUGGGGGAA CGCCGAUCGU
 501 GCGCAUCCGU CACCCUCGC CGCAGUGGG GCUUGUGAA CCCCCAACCC
 551 UGACUGACUG GGCAGUGUG CUGCAAUUG GCAGAUCAU CGUCCAAUCG
 601 CUAAUCUCUC AUGGCAGUG AGCCGGGGUU GCCUGGAGCC
 651 GUUCCUGCGU GGUUCUCCC GUCUUCGCU UUUGUUGCC UUUUAUGGU
 701 GUAUUACAAC UUAUUCUG CUCUGCAGAU UUUGUUGAGG UUUUUGCUUC
 751 UCCCAAGGUA GAUCUCGACC AGUCCCUCAA CGGGUGUGG GGAGAACAGU
 801 CAUUUUUUU UGAGAGAUCA UUAACAUUU AAUGAAUUA UAAUUAGAAG
 851 AUCUAAUGA ACAUUGGAA UUGUGUCCU UUAUGGUCA UCGGUUUAUG
 901 CCAGAGGUUA GAAGUUUCU UUUUGAAAA UUAGACCUUG GCGAUGACCU
 951 UGAGCAGUAG GAUAUAACCC CCACA

Abb. 9